

REC'D 01 MAR 2005

WIPO

PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

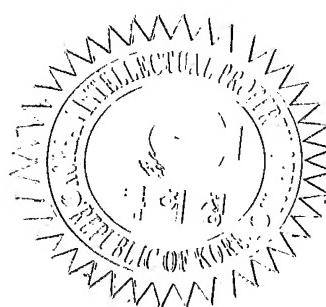
This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2004-0006185
Application Number

출 원 년 월 일 : 2004년 01월 30일
Date of Application JAN 30, 2004

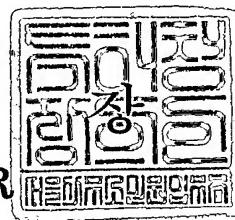
출 원 인 : 주식회사 라이프엔자
Applicant(s) LIFENZA CO., LTD.

2005 년 01 월 12 일



특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.07.13
【구명의인(양도인)】	
【성명】	김도만
【출원인코드】	4-1998-045445-7
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	주식회사 라이프엔자
【출원인코드】	1-2000-028875-1
【대리인】	
【명칭】	특허법인씨엔에스
【대리인코드】	9-2003-100065-1
【지정된변리사】	손원, 염승윤
【포괄위임등록번호】	2003-045937-3
【포괄위임등록번호】	2004-048046-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2004-0006185
【출원일자】	2004.01.30
【심사청구일자】	2004.01.30
【발명의 명칭】	유탠, 이눌린 및 레반을 분해하는 단백질, 그 단백질을 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 단백질의 생산 방법
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2004-0006186
【출원일자】	2004.01.30
【심사청구일자】	2004.01.30
【발명의 명칭】	아밀로펙틴, 전분, 글리코겐 및 아밀로즈 분해활성을 갖는 단백질, 그 단백질을 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 단백질의 생산방법
【변경원인】	전부양도

1020040006185

출력 일자: 2005/1/13

【취지】

특허법 제38조제4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조 제1항의 규정에 의하여 위와
같이 신고합니다. 대리인
특허법인씨엔에스 (인)

【수수료】

26,000 원

【첨부서류】

1. 양도증_2통 2. 인감증명서_1통

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	2004.01.30
【국제특허분류】	C12N 1/16
【발명의 명칭】	뮤탠, 이눌린 및 레반을 분해하는 단백질, 그 단백질을 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 단백질의 생산 방법
【발명의 영문명칭】	Protein with the hydrolysis of mutan, inulin and levan, gene encoding said protein, the expressing host cell and methods for producing said protein
【출원인】	
【성명】	김도만
【출원인코드】	4-1998-045445-7
【대리인】	
【명칭】	특허법인 씨엔에스
【대리인코드】	9-2003-100065-1
【지정된변리사】	손원, 염승윤
【포괄위임등록번호】	2003-045937-3
【발명자】	
【성명】	김도만
【출원인코드】	4-1998-045445-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강희경
【성명의 영문표기】	KANG, Hee Kyoung
【주민등록번호】	740129-2932346
【우편번호】	506-010
【주소】	광주광역시 광산구 송정동 라인2차아파트 105동 803호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이진하
【성명의 영문표기】	LEE, Jin Ha
【주민등록번호】	730521-2559913

【우편번호】 502-801
【주소】 광주광역시 서구 광천동 576-10번지
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 한국 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 10574BP
【수탁일자】 2003.12.24
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 4
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
특허법인씨엔에스 (인)
【수수료】
【기본출원료】 30 면 38,000 원
【가산출원료】 0 면 0 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 10 항 429,000 원
【합계】 467,000 원
【감면사유】 개인 (70%감면)
【감면후 수수료】 140,100 원
【첨부서류】 1. 미생물기탁증명서_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 뮤탠, 이눌린 및 레반을 분해하는 효소에 관한 것으로, 서열 목록 1의 아미노산을 포함하는 단백질 또는 그것의 변이체, 이들의 단편으로써 텍스트란 분해활성, 전분 분해활성을 가지며, 불용성 글루칸인 뮤탠, 이눌린 및 레반을 분해하는 효소, 그 효소를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 발현하는 형질전환된 세포를 제공한다. 또한 본 발명은 상기의 세포를 배양하는 단계, 상기 배양된 세포에서 효소를 발현하는 단계 및 발현된 효소를 정제하는 단계를 포함하는 텍스트라네이즈 활성을 가지며 전분과 불용성 글루칸인 뮤탠, 그리고 이눌린과 레반을 분해하는 효소의 생산 방법과 상기의 방법에 의해 생산된 효소 및 그 효소를 포함하는 조성물을 제공한다.

본 발명에 의해 제공되는 효소는 우수한 플라크 형성 억제능과 플라크 분해능을 가져 치태제거나 구강세정용으로 유용하며 또한 우수한 텍스트란 분해능을 가져 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로도 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

리포마이세스 스타케이, 플라크, 텍스트란, 뮤탠, 이눌린, 레반

【명세서】**【발명의 명칭】**

뮤텐, 이눌린 및 레반을 분해하는 단백질, 그 단백질을 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 단백질의 생산 방법{Protein with the hydrolysis of mutan, inulin and levan, gene encoding said protein, the expressing host cell and methods for producing said protein}

【도면의 간단한 설명】

도 1a, b는 리포마이세스 스타케이(*Lipomyces starkeyi*)에서 분리한 본원발명의 LSD1 탄수화물 가수분해효소의 아미노산 서열 및, 이를 코딩하는 2052 bp의 cDNA 단편의 염기서열이다(이중 밑줄친 곳은 벡터에 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 부분임).

도 2는 본원발명의 탄수화물 가수 분해 효소(LSD)의 활성 및 안정성에 대한 pH의 영향을 나타낸 것이다.

도 3은 본원발명의 탄수화물 가수 분해 효소(LSD)의 활성 및 안정성에 대한 온도의 영향을 나타낸 것이다.

도 4는 재조합 클론 pYLSD1에 의해 생산된 본원발명의 탄수화물 가수 분해 효소를 사용하여 글루칸인 텍스트란, 전분과 뮤텐 그리고 플락탄인 레반과 이눌린을 가수분해한 TLC 결과를 나타낸 것이다(사진에서 Mn은 일련의 말토덱스트린(maltodextrin)을, IMn은 일련의 이소말토덱스트린(isomaltodextrin)을 표시하며, E는 효소액이며, 1-5 레인은 효소를 실활시킨 후 기질 반응 시킨 것이며, 6-10 레인은 효소와 각 기질을 반응시킨 것이다. 1과 6 레인은 전분과 효소의 반응액을 보여주며, 2과 7 레인은 텍스트란과 효소 반응액이며, 3과 8 레인은 뮤텐과



1020040006185

출력 일자: 2005/1/13

효소 반응액을 보여 준다. 4와 9 레인은 레반과 효소 반응액을 보여주고, 5과 10 레인은 이눌린과 효소 반응액을 보여준다.).

도 5는 본원발명의 효소의 하이드록시아파타이트에 대한 결합성을 페니실린움에서 추출한 텍스트라네이즈와 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<6> 본 발명은 텍스트란 분해활성, 전분 분해 활성을 가지며, 불용성 글루칸인 뮤坦, 이눌린 및 레반을 분해하는 효소, 그 효소를 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 효소의 생산 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게 본 발명은 플라크 형성 억제능과 플라크 분해능을 가져 치태제거나 구강세정용으로 유용하며 또한 우수한 텍스트란 분해능을 가져 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로도 유용한 효소, 그 효소를 코딩하는 유전자, 그 발현 세포 및 상기 효소의 생산 방법에 관한 것이다.

<7> 일반적으로 치아 표면에 형성되는 막(플라크)은 치밀하게 팩킹된 세균과 비 세포성 물질로 이루어진다. 플라크의 주요 다당 성분은 물에 녹지 않는 글루칸(불용성 글루칸) 또는 뮤坦(mutans)으로, 플라크 건조총량의 약 20%를 차지하며, 충치를 유발시키는 주요 원인 중 하나이다. 스트렙토코커스 뮤тан스(*Streptococcus mutans*)에 의해 생산되는 글루칸의 구조 연구를 통해 불용성 글루칸은 주로 알파-1,3, 알파-1,4, 알파-1,6-D-글루코사이드 결합으로 이루어진다

는 것이 보고되었다. 따라서 플라크를 효과적으로 제거하기 위해서는 뮤텐 분해 활성, 전분 분해 활성 및 텍스트란 분해활성이 필요하다.

- <8> 종래에는 플라크 형성이나 충치를 억제하기 위한 방법으로 스트렙토코커스 뮤텐스(*Streptococcus mutans*)(이하, *S. mutans*)의 성장을 억제하는 방법이 제시되었으며, 이를 위하여 *S. mutans* 성장을 억제하는 항생물질이나 불소와 같은 화합물을 치약이나 구강세정제와 같은 구강용 제품에 포함시켜 사용하는 것이 제시되었다. 대표적인 항 충치용 화합물로 사용되는 불소는 충치 유발균의 성장을 억제하는 효과는 있으나 매우 낮은 농도에서도 반상치(치아의 에나멜질에 흰 반점이 생기는 현상), 강한 독성과 대기오염등의 부작용이 심하다. 텍스트라네이즈와 같은 효소로도 충치 억제를 시도하고 있으나 그 효과는 아직 불분명하다.
- <9> 미국특허 5,741,773에는 항플라크 및 항충치 활성이 있는 글라이코매크로펩타이드를 함유하는 치약 조성물을 제공하고 있다. 그러나, 이 특허는 단지 항충치의 박테리아 공급원의 성장억제에 관한 것이며, 플라크 형성 억제나 이미 형성된 플라크의 분해는 제시하지 못하였다.
- <10> 한편 플라크의 형성 억제와 이미 형성된 플라크의 분해를 위하여 다양한 구조의 다당을 분해하는 텍사메이즈 효소를 이용하고자 제안된 연구가 본 발명자에 의해 제안된 바 있다(국내 특허 등록 10-0358376; 미국특허 6,485,953). 상기 특허에는 다양한 다당을 분해하는 효소를 생산하는 미생물(*Lipomyces starkeyi* KFCC-11077)과 그 효소 및 이를 포함하는 조성물에 관한 내용이 기술되어 있다.
- <11> 하지만, 플라크 형성을 효과적으로 억제시킬 수 있고, 보다 우수한 플라크 분해효과를 갖는 새로운 효소가 계속 요구되고 있는 실정이다.

- <12> 또한 본 발명자들은 상기 특허(국내특허 등록 10-0358376)에서 사용하는 미생물(*Lipomyces starkeyi* KFCC-11077)로부터 얻어진 효소, 즉 텍스트란 효소는 우수한 텍스트란 분해능을 가져 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로 유용하게 사용될 수 있음을 제시한 바 있다(대한민국 특허출원 10-2001-48442).
- <13> 이에 따라 보다 우수한 플라크 형성 억제능과 플라크 분해능을 가지며, 바람직하게는 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로도 사용될 수 있는 우수한 텍스트란 분해능을 나타내는 새로운 효소를 개발할 필요가 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <14> 본 발명은 상기한 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 개발된 것으로서, 본 발명의 목적은 플라크 형성을 억제하거나 플라크를 분해하는 활성을 가지며 우수한 텍스트란 분해능을 나타내는 새로운 효소 및 그 효소를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.
- <15> 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 생산하는 균주를 제공하는 것이다.
- <16> 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 효소 및 유전자를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- <17> 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 효소를 포함하는 산업적으로 유용한 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <18> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열 목록 1의 아미노산을 포함하는 단백질, 이의 변이체, 또는 이들의 단편으로써 텍스트란 분해활성, 전분 분해 활성, 프릭탄 분해 활성을 가지며 불용성 글루칸인 뮤tan, 이눌린 및 레반을 분해하는 효소를 제공한다.

- <19> 또한 본 발명은 상기 단백질 또는 그것의 변이체, 이들의 단편을 코딩하는 서열 목록 2의 유전자, 그 변이체, 또는 그 단편을 제공한다.
- <20> 또한 본 발명은 상기 유전자를 발현하는 형질전환된 세포를 제공한다.
- <21> 또한 본 발명은 상기의 세포를 배양하는 단계, 상기 배양된 세포에서 효소를 발현하는 단계 및 발현된 효소를 정제하는 단계를 포함하는 정제된 텍스트라네이즈 활성을 가지며, 전분, 불용성 글루칸인 뮤坦 그리고 이눌린과 레반을 분해하는 효소의 생산 방법과 상기의 방법에 의해 생산된 효소 및 그 효소를 포함하는 조성물을 제공한다.
- <22> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <23> 본 발명의 탄수화물 가수 분해 효소 (혹은 대표적으로 글리카네이즈; LSD) 유전자를 얻기 위하여, 리포마이세스 스타케이(*L. starkeyi*) 를 텍스트란이 첨가된 배지에서 배양한 후 얻은 폴리(A)+ RNA를 분리하였고, 여기에서 지금까지 알려진 텍스트란 분해 효소의 유전자의 공통되는 아미노산의 정보를 이용하여 글리카네이즈의 예상되는 보존 부위(conserved region)의 프라이머를 제작, PCR을 통해 약 1.1 kb의 PCR 단편을 얻었다. 이 단편의 서열을 이용하여 5'RACE와 3' RACE를 통하여 완전한 텍스트라네이즈 유전자를 얻었다. 이 유전자를 다시 PCR을 통하여 사크로미세스 세레비지아에(*S. cerevisiae*) 벡터인 pYES2에 클로닝을 실시하였고, *S. cerevisiae* INVSc1으로 형질전환(transformation)을 시켜 형질전환체를 얻었다. *S. cerevisiae* 형질전환체는 블루 텍스트란과 갈락토오스(galactose)가 첨가된 배지에서 블루 텍스트란이 분해되어 분명한 헤이로우(halo)가 형성되는 클론 pYLSd1을 얻었다.



1020040006185

출력 일자: 2005/1/13

- <24> 리포마이세스 스타케이(*Lipomyces starkeyi*, 이하, *L. starkeyi*라 함)는 텍스트란을 분해하는 엔도-텍스트라네이즈(EC 3.2.1.11)와 전분을 분해하는 알파-아밀레이즈를 생산한다고 보고되었다. 이 미생물은 식품에 응용되고 있으며 항생물질이나 기타 독성 물질을 생산한다는 보고는 없다.
- <25> 몇몇 세균성 텍스트라네이즈를 제외하고는 미생물에 의해 생산되는 텍스트라네이즈는 일반적으로 유도성 효소로 알려져 있다. 본 발명자는 텍스트라네이즈 및 아밀레이즈 모두를 항상 생산하는 *L. starkeyi* ATCC 74054를 보고한 바 있으며(미국특허 5, 229, 277), 이 미생물이 생산하는 효소의 특성을 밝히면서 슈크로오스 및 전분을 사용하여 작은 크기의 텍스트란을 생산하는 것으로 보고하였다. 본 발명자는 *Lipomyces starkeyi* KFCC-11077을 이용하여 텍스트란과 전분을 동시에 분해할 수 있는 텍사메이즈 효소를 생산하는 미생물과, 이 미생물의 효소, 그리고 이 효소를 포함하는 조성물에 관한 특허를 등록하였다 (미국특허 6,485,953(2002.11.26), 국내특허 등록 10-0358376(2002. 10. 11)).
- <26> 본 발명의 유전자(*IsdI*)로부터 생산되는 효소는 텍스트란을 분해할 뿐 아니라 전분, 불용성 글루칸인 뮤坦을 분해하는 효소이다. 본 발명에 따른 글리카네이즈는 텍스트란을 기질로 사용하였을 때 주로 글루코오스, 이소말토오스 및 이소말토트리아오스을 생산하고, 이외에 분지 5탄당 및 분지 6탄당을 생산한다.
- <27> 본 발명에 따른 글리카네이즈 효소는 프락тан의 폴리머인 레반(levan)과 이눌린을 분해할 수 있으므로 플라크 형성 성분인 프락тан(fructan)도 효과적으로 분해할 수 있다.
- <28> 따라서 본 발명에 따른 글리카네이즈 효소는 수용성 글루칸과 불용성 글루칸을 모두 효과적으로 분해한다. 또한 글루칸과 세균의 응집을 제해함으로써 플라크 형성을 억제하거나 형성된 플라크를 제거할 수 있으므로, 충치 예방에 효과적이다.

<29> 치아의 구성 성분과 유사한 하이드록시아파테이트를 이용하여 효소의 결합 정도를 실험한 결과, 글리카네이즈는 하이드록시아파테이트에 대한 결합을 유지하는 특성을 보여 글리카네이즈가 치아에 잔존 능력이 있음을 추정한다.

<30> 또한 본 발명은 글리카네이즈를 생산하는 유전자를 가지는 신규한 미생물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 균주 사크로미세스 세레비지아에(*Sacchromyces cerevisiae*)는 2003년 12월 24일자로 대한민국 대전시 유성구에 있는 생명공학 연구소 유전자은행(KCTC)에 기탁하였으며 기탁번호 KCTC10574BP를 부여받았다

<31> 또한 본 발명은 글리카네이즈 효소를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 물론 pYLCD1을 배양하고, 여기서 세포를 회수하여 글래스 비드를 이용하여 세포를 깬 후 얻은 배양액으로부터 글리카네이즈 효소를 회수하는 것으로 이루어진다. pYLCD1로부터 얻은 글리카네이즈 효소와 *L. starkeyi* KFCC-11077에서 분리한 글리카네이즈의 특성은 실질적으로 동일하다.

<32> 본 발명에서 RNA 분리 및 글리카네이즈 유전자 선별을 위한 DNA 도너(donor)로 사용한 균은 *Lipomyces starkeyi* KFCC 11077로 구성적으로 텍스트라네이즈와 아밀레이즈의 활성을 갖는 글리카네이즈를 생산한다.

<33> *L. starkeyi* KFCC 11077은 28℃에서 호기적인 조건으로 LMD 배지를 이용하여 배양하였다. LMD 배지조성은 1%(w/v) 텍스트란, 1%(v/v) 미네랄 용액, 0.3%(w/v) 효모추출물이며, 미네랄 용액 조성은 2%(w/v) MgSO₄·7H₂O, 0.1%(w/v) NaCl, 0.1%(w/v) FeSO₄·7H₂O, 0.1%(w/v) MnSO₄

· H₂O, 0.13%(w/v) CaCl₂·2H₂O이다. *Escherichia coli* DH5α 와 pGEM-T easy (Promega, USA) 플라스미드는 일반적인 DNA 작업과 염기서열 분석을 위해 이용하였다. *S. cerevisiae* INVSc1는 글리카네이즈를 발현하기 위한 pYLSD1의 숙주세포로 사용되었고, YPD 배지 (yeast extract 10g/1, peptone 20g/1 and glucose 20g/1)에서 배양을 한다. *S. cerevisiae* 배양은 합성 텍스트로즈(SD), 합성 보체(SC) 그리고 YPD 배지를 사용하였다.

<34> 본 발명의 효소를 포함하는 조성물은 다양한 구강보호 제품, 예를 들어 치태제거, 구강 세정용 조성물, 치약 등에 사용될 수 있으며, 또한 본 발명의 효소는 텍스트란 및 아밀로오스와 같은 탄수화물 다당을 분해하는 능력을 가져 특히 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로도 유용하게 사용될 수 있다. 또 본 발명의 효소를 포함하는 조성물은 껌, 음료, 유류 등의 식품에 응용될 수 있으며, 조성물의 구체적인 조성은 그것이 속하는 기술분야의 통상의 전문가에 의해 어렵지 않게 조합하여 결정될 수 있을 것이다.

<35> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

<36> 실시예 1: *L. starkeyi*에서 poly(A)+ RNA 분리

<37> *L. starkeyi* KFCC-11077을 LMD 액체 배지에 접종하여 28°C, 36시간 배양한 후 지수성장기 중반에 다다르면, 원심분리(6,500 x g)를 통하여 세포 펠렛(pellet)을 얻었다. 세포 펠렛은 GIT용액[4M 구아니딘 이소싸이오시아네이트, 25mM 소디움 사이트레이트(pH 7.0)], 0.1% DEPC 처리한 중류수에 녹인 0.5% 라우로일사르코실(lauroyl sarcosyl), 0.1M 2-멜캅토에탄올에

녹였고, 여기에 산으로 씻어준 글래스 비드와 동량의 페놀(pH 4.0)을 첨가하여 2분간 볼텍스한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 이소프로판올을 첨가하여 전체 RNA를 침전시켰다. mRNA는 올리코텍스 레진(oligotex resin)를 이용하여, 형성된 oligotex-mRNA 복합체에서 분리하였다 (Oligotex mRNA kit, Qiagen).

<38> 실시예 2: LSD1의 RT-PCR 증폭

<39> 퍼스트 스트랜드 cDNA 합성은 변형된 올리고-dT 프라이머, T18NN (5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTT-3')을 이용하여 *L. starkeyi*에서 분리한 0.5 g 의 전체 RNA를 역전사반응에 의해 준비하였다. 10 μ l의 퍼스트 스트랜드 cDNA는 글리카네이즈를 코딩하는 염기서열의 일부를 증폭하는데 이용하였다. 디제네레이트 프라이머인 DC-F와 DC-R는 보고된 텍스트라네아제의 7개의 보존 부위에 의거하여 제작하였다. 웹타이드 서열인 TWH(D/N)(N/S/T) (보존 부위 I) 과 YKQVG(S/A) (보존 부위 V) 부분을 이용하여 각각의 프라이머 DC-F (5'-ACCTGGCA(T/C)AG(A/G)(A/T/G)(A/C)(C/A)-3')와 DC-R (5'-G(G/C)(C/T)(T/G)CC(G/C)ACCTGCTT(A/G)TA-3')를 제작하였고, 이 프라이머를 사용하여 PCR 을 실시하여 1.1 kb의 글리카네이즈 DNA의 단편(fragment)을 증폭하였다. PCR 산물은 AccPrepTM gel extraction kit (Bioneer, 한국)를 이용하여 아가로즈 겔에서 정제하였다. 정제 된 PCR 산물은 pGEM-T easy vector (Promega, 미국)에 라이게이션을 실시하였고, DNA 염기서열 분석을 한국기초과학연구소(KBSI)에 의뢰하였다. 글리카네이즈의 완전한 유전자를 얻기 위하여 1.1 kb 유전자의 정보를 이용하여 cDNA의 완전한 크기의 글리카네이즈의 유전자를 얻었다. 이때 5'RACE (rapid amplification of cDNA ends)과 3'RACE를 실시하였는데, 5'full RACE Core Set와 3' full RACE Core Set (TaKaRa, 일본)을 사용하였다. 5'RACE를 통하여 5' 부분의 180

bp의 PCR 산물을 얻을 수 있었고, 3'RACE를 통해서 900 bp의 산물을 얻어 약 2 kb의 글리카네이즈 유전자(*lsdI*)를 얻었다.

<40> 실시예 3: 글리카네이즈 유전자의 염기 및 아미노산서열분석

<41> 염기서열분석 반응을 위한 프라즈미드 DNA는 알카라인 라이시스 방법에 의하여 준비하였다. 염기서열분석 반응은 GeneAmp 9600 thermal cycler DNA sequencing system(model 373-18, Applied Biosystems, USA)을 이용하여 ABI PRISM Cycle Sequencing Kit(Perkin Elmer Corp. USA.)를 이용하여 수행하였다. 서열분석 결과를 도 1, 그리고 서열 목록 1 및 2에 나타내었다.

<42> 글리카네이즈 유전자를 가지고 있는 DNA 단편의 염기서열은 1824 bp의 염기로 구성되어 진 하나의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 가지고 있었다. 추정된 아미노산 서열은 확인된 염기서열의 42번째 뉴클레오티드 위치의 시작 코돈(ATG)으로부터 1868 번째 위치의 종결 코돈(TGA)까지 위치한다. 구조 유전자의 아미노산은 608개로 구성되어 있고, 분자량은 계산에 의하면 67.6 kDa이다.

<43> 실시예 4: *S. cerevisiae*벡터인 pYLSD1 (pYES2-LSD1) 제작 및 *S. cerevisiae*로의 형질전환 후 유전자 발현 균 선별

<44> *L. starkeyi*를 YPD에 배양한 후 세포를 회수하고, 게노믹 DNA는 Schwartz and Cantor의 방법에 의거하여 분리하였다. 글리카네이즈 유전자(*IsdI*)에 해당하는 DNA 단편은 Taq DNA polymerase와 합성된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 DX-F: 5'-GTCCCTTGAGCTCCCAAC-3'(서열목록 3) 와 DX-R: 5'-TCAACTAGAATT~~CAT~~GAACTTCC-3'(서열목록 4)를 이용하여 PCR를 수행하였다. DNA 증폭은 변성(94°C, 1분), 어닐링(52°C, 1분), 연장(72°C, 2분)을 30회 수행하였다. PCR 산물은 pGEM-T easy vector에 라이게이션, 형질전환을 실시하였다. 여기서 얻은 플라스미드를 EcoRI으로 처리하여 PCR 산물을 얻었고, pYES2 벡터 (Invitrogen, USA) 또한 EcoRI으로 처리하였다. 벡터인 경우 셀프-라이게이션을 방지하기 위하여 CIAP를 처리한 후 PCR 산물과 라이게이션하고, 형질전환을 통해 클로닝을 실시하였고, 그 결과 pYLSD1을 제작하였다. *S. cerevisiae*로의 형질전환은 일렉트로포레이션 방법에 의해 수행하였다. 이때 SC 배지에서 자란 형질전환체는 유도배지(induction medium : 2% galactose, 0.3% blue dextran 함유하고 우라실이 없는 SC)에서 선별한다. 플레이트는 30°C에서 2-6일간 배양을 하면 텍스트란이 가수분해되어 콜로니 주변으로 환이 생성된다. 여기에서 블루 텍스트란이 가수분해되어 분명한 헤이로 가 형성되는 콜로니를 선별하고 클론 pYLSD1으로 명하였다.

<45> 실시예 5: 글리카네이즈 유전자 발현 쿠 선별

<46> 플레이트 상에서 활성이 있었던 클론들을 상등액 상에서의 활성을 확인하기 위하여, 갈락토오스(galactose) 유도(induction)를 실시하였다. 선별된 콜로니는 2%의 갈락토오스와 1% 포도당(glucose)이 첨가된 SC 액체배지 50 ml에 OD 600에서 1이 되도록 접종을 한 뒤 30°C에서 72시간 배양하였다. 세포는 원심분리(5000 rpm, 5 분)를 통해 회수하였고, 5 ml의 20mM 시트레이트/포스페이트 버퍼(pH 5.5)에 녹였다. 0.45 mm 유리 비드 0.1 g을 첨가한 후 3분간 보텍

성을 실시하였다. 원심분리 (6000 rpm, 2 분) 후 세포내 단백질 추출물에서 상등액을 조심스럽게 회수하였다. 이 상등액에 존재하는 글루코오스, 이당, 그리고 올리고당을 제거하기 위하여 폴리에틸렌글리콜(PEG, MW=150,000-20,000)을 첨가하여 4°C에서 반응시켜 농축을 실시하였다. 이 PEG 농축액은 20mM 시트레이트/포스페이트 버퍼(pH 5.5)에 투석하였으며 원래의 양이 되도록 하였고, 이 투석액을 단백질 활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다. 이 효소액을 1% 텍스트라네이즈과 1 : 1로 혼합하여, 16시간동안 반응시킨 후 활성을 확인하였다.

<47> 실시예 6: 효소의 활성측정

<48> 환원 값(Reducing value)을 측정하기 위하여, 구리-바이신코나이네이트 (copper-bicinchoninate) 방법을 이용하였다. 즉, 100 μ l 구리-바이신코나이네이트 시약과 100 μ l의 효소 반응액을 첨가한 후 80°C에서 35분간 반응시킨 후 약 15분정도 냉각을 시켜준다. 그리고 나서 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 글리카네이즈 효소의 텍스트라네이즈 활성은 2% 텍스트란을 포함하는 완충액에 효소액을 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켜 생성되는 이소말토오스 양을 측정하여 결정한다. 텍스트라네이즈 1 유니트는 텍스트란을 기질로 37°C에서 1분 반응시켰을 때 이소말토오스 1 μ mol을 생성하는 효소량으로 정의된다.

<49> 실시예 7: 글리카네이즈 효소의 pH, 온도에 대한 최적 활성과 안정성 측정

<50> 글리카네이즈 효소의 텍스트라네이즈 효소 활성의 최적 pH는 pH 4.1 - 7.7의 텍스트란 기질과 37°C에서 16 시간 반응시켜 텍스트라네이즈의 활성을 구리-바이신코나이네이트 방법을

사용하여 결정하였다. 효소의 pH 안정성은 각각의 버퍼에 효소를 넣어 22°C에서 3시간 방치한 후, 측정하였다.

- <51> 효소의 최적 활성 온도는 다양한 온도(10 - 60°C)에 효소를 16시간 넣어 둔 후, 반응 속도를 측정하여 결정하였으며 온도 안정성은 다양한 온도(10 - 60°C)에 효소를 3시간 넣어 둔 후, 남은 활성도를 측정하여 구하였다.
- <52> 텍스트라네이즈 활성은 pH 5.5에서 최적 활성을 보였으며 활성은 pH 5.0-5.7에서 최적 활성의 80% 이상을 유지하였다(도 2, 표1).

<53> 【표 1】

글리카네이즈 활성 및 안정성에 대한 pH 효과 텍스트란 분해 활성	
적정 pH	5.5
안정한 pH 범위	5.0 - 5.7

- <54> 상기 표에서 안정한 pH 범위란 잔여활성이 초기 활성의 80% 이상인 것을 의미한다.
- <55> 최적의 효소 활성을 나타내는 온도는 37°C였으며, 37°C 이하에서 초기 활성의 80% 이상을 유지하였다(도 3, 표2).

<56> 【표 2】

글리카네이즈 안정성에 대한 온도의 효과	
	덱스트란 분해 활성
안정한 온도(°C)의 범위	≤37

<57> 상기 표에서 안정한 온도의 범위란 잔여활성이 초기 활성의 80%이상인 것을 의미한다.

<58> 실시예 8: 다양한 기질에 대한 덱스트란네이즈 효소의 분해 특성

<59> 효소액의 여러 가지 기질에 대한 분해를 조사하였다. 덱스트란과 수용성 전분, 그리고, 글루칸 이외에 1% (w/v)의 다양한 구조의 고분자 중합체들의 수용액을 준비하여 효소농축액과 동량으로 혼합하여 37°C에서 16시간 반응 시킨 후, 가수분해 산물을 분석하였다. 고분자 중합체들의 가수분해 확인에는 덱스트란, 전분, 레반(D-후렉토스(fructose)가 β -2,6으로 결합된 다당), 이눌린 (D-후렉토스가 β -2,1으로 결합된 다당), 뮤坦(D-글루코스가 α -1,3으로 결합된 다당)을 사용하였다.

<60> 덱스트란과의 기질 반응을 통해서는 주로 글루코스, 이소말토스, 이소말토트리오스, 이소말토테드라오스를 각각 0.1%, 19.3%, 24.2%, 17.0% 생산하였으며 이밖에도 측쇄(branched) 올리고 사카라이드를 생산하였다. 따라서 글리카네이즈는 덱스트란 반응에 있어서 엔도-덱스트라네이



1020040006185

출력 일자: 2005/1/13

즈 형태의 반응을 하는 것으로 사료된다(도 4). 전분에 대한 분해능을 확인한 결과, 대부분 글루코오스로 분해됨을 알 수 있었다.

<61> 클론 pYLDS1에서 생성된 글리카네이즈 효소의 분해 특성을 알아보기 위하여 다양한 구조의 고분자 중합체들과 효소를 반응시킨 결과, 뮤坦과 같은 α -1,3-D-글루코사이드 결합을 포함하는 고분자 중합체 뿐만 아니라, β -결합의 이눌린에 대한 가수분해 특성도 약하지만 확인할 수 있었다. 텍스트란 분해능을 100%로 환산하였을 때, 전분 분해능은 54%, 뮤坦은 8%, 레반은 3%, 이눌린은 7%의 분해능을 가짐을 알 수 있었다(표 3).

<62> 【표 3】

다양한 기질에 대한 글리카네이즈 효소의 상대적 분해능

기질	상대적인 활성(%)	
모균 (<i>L. starkeyi</i>)의 글리카네이즈	LSD1 글리카네이즈	
텍스트란	100	100
전분	92	54
뮤텐	16	8
레반	22	3
이눌린	18	7

<63> 실시 예 9: 하이드록시아파타이트(HA)에 대한 텍스트라네이즈 결합

<64> 칼슘 포스페이트 세라믹들은 직접적으로 뼈에 붙을 수 있는 능력 때문에 뼈의 대체 물질로 많이 이용되어지고 있다. 이중에서 하이드록시아파타이트(HA)는 뼈에 존재하는 천연 인화석들과 비슷한 많은 결정학적인 특성을 가지고 있어서 인공뼈와 치아 등의 연구에 있어 대체 물

질로 많이 이용이 되고 있다. HA에 대한 글리카네이즈의 결합성을 살펴보았다. 하이드록시아파타이트(Bio-Gel HTP, Bio-Rad Laboratories, Richmond CA)를 10 mM 포스페이트 버퍼(pH 6.8)에 혼탁하여 준비하였다. 글리카네이즈를 동일 완충용액에 용해하여 준비하였다. 200 μ l씩 HA와 효소를 혼합하여 60분 동안 흡착시켰다. 흡착되지 않은 효소를 씻어낸 후, 1 M NaCl을 포함한 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mM 포스페이트 버퍼(pH 6.8)를 이용하여 단계적으로 흡착된 효소를 용출시켰다. 용출된 효소 분획을 모아 글리카네이즈의 활성을 측정하였다.

<65> 도 5에서 보이는 것과 같이 글리카네이즈는 하이드록시아파타이트 300 mM에서 용출되었 다. 또한 하이드록시아파타이트에 잔존하는 비율이 페니실리움에서 생산되는 텍스트라네이즈보다 높음을 알 수 있었다. 이 결과로부터 글리카네이즈는 하이드록시아파타이트에 대한 결합성이 강하여 치아에 오랫동안 머무를 수 있음을 보여 주었다.

<66> 상기한 구성에서 살펴본 바와 같이 본 발명의 *Lipomyces starkeyi*에서 생산되는 글리카네이즈(EC 3.2.1.11)는 약 70 kDa 크기인 단일 단백질이고, PCR을 통해 얻은 DNA 염기서열 분석 결과, 1824 bp의 염기로 구성되어진 하나의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 가지고 있었다. 추정된 구조 유전자의 아미노산은 608개로 구성되어 있고, 분자량은 약 67.6kDa이었다.

<67> 또 조효소액의 글리카네이즈의 텍스트란과의 반응 최종산물은 엔도-텍스트라네이즈의 전형적인 산물이었다. 텍스트란 분해 활성은 주로 글루코스, 이소말토스, 이소말토트라이오스, 그리고 이소말토테드라오스를 각각 0.1%, 19.3%, 24.2%, 17.0% 생산하였고, 이밖에도 측쇄 펜타사카라이드를 생산하였다. 또한 글리카네이즈의 다양한 탄수화물에 대한 분해 특성을 알아보기 위해 여러 가지 구조의 고분자 중합체들과 효소를 반응시킨 결과, 뮤坦과 같은 α -1,3-D-글

루코사이드 결합을 포함하는 고분자 중합체 뿐만 아니라, β -결합의 레반과 이눌린과 같은 프락탄에 대한 가수분해 특성도 보였다.

【발명의 효과】

<68> 본 발명에 의해 제공되는 효소는 우수한 플라크 형성 억제능과 플라크 분해능을 가져 치태제거나 구강세정용으로 유용하며 또한 우수한 텍스트란 분해능을 가져 설탕 제조시 텍스트란 제거용으로도 유용하게 사용될 수 있다.



1020040006185

출력 일자: 2005/1/13

【특허청구범위】

【청구항 1】

덱스트란 및 전분 분해 활성을 가지며, 불용성 글루칸인 뮤坦, 이눌린 및 레반을 분해하는 특성을 갖는 서열 목록 1의 아미노산을 포함하는 단백질, 이의 변이체, 또는 이들의 단편.

【청구항 2】

제 1항의 단백질, 이의 변이체, 또는 이들의 단편을 코딩하는 서열 목록 2의 유전자, 이의 변이체, 또는 이들의 단편.

【청구항 3】

제 2항의 유전자, 이의 변이체, 또는 이들의 단편을 발현하는 형질전환된 세포.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기의 세포는 원핵 세포 또는 진핵세포인 것을 특징으로 하는 세포.

【청구항 5】

제 3항 또는 제 4항에 있어서, 상기 세포는 사크로미세스 세레비지아에 (*Saccharomyces cerevisiae*) (KCTC10574BP, 2003. 12. 24)인 것을 특징으로 하는 세포.

【청구항 6】

(a) 제 3항의 세포를 배양하는 단계;

(b) 상기 배양된 세포에서 효소를 발현하는 단계; 및

(c) 발현된 효소를 정제하는 단계를 포함하는 정제된 덱스트란 및 전분 분해활성과 불용성 글루칸인 뮤坦, 이눌린 및 레반을 분해하는 효소의 생산 방법.



1020040006185

출력 일자: 2005/1/13

【청구항 7】

제 6항의 방법에 의해 생산된 효소.

【청구항 8】

제 7항의 효소를 포함하는 조성물.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 조성물은 설탕 제조시 엑스트란 제거용으로 사용됨을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

제 8항에 있어서, 상기 조성물은 치태제거 또는 구강세정용으로 사용됨을 특징으로 하는 조성물.

【도면】

【도 1a】

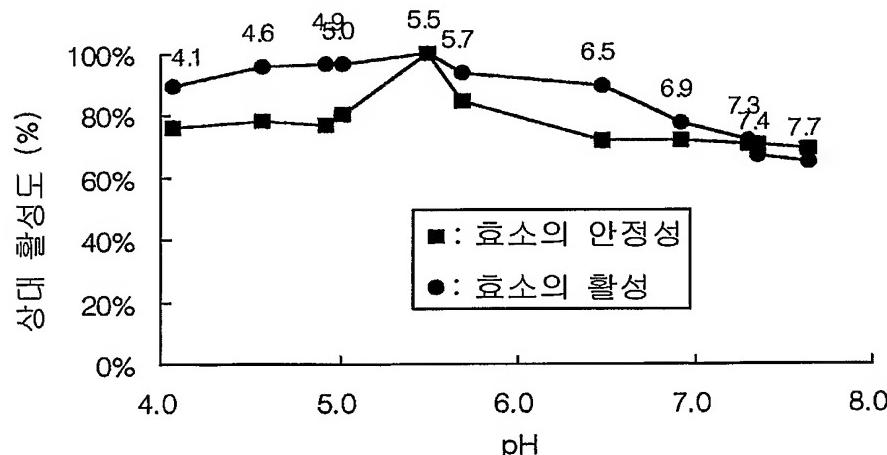
1 tgggtgtgtcccttgcctgccaacgttgtgattgtttcatgacattaatctacgtgc
 1 Met Thr Leu Ile Tyr Val
 61 cttaaatttacaatggtcccctaattcacacggattgtactggtaacattctgttgg
 7 Pro Ser Ile Phe Thr Met Val Pro Ser Ile Thr Arg Ile Val Leu Val Asn Ile Leu Leu
 121 cgacgttgggttggagctgcagtccctccacgagacaacagaactgttgccggagtc
 27 Ala Thr Leu Val Leu Gly Ala Ala Val Leu Pro Arg Asp Asn Arg Thr Val Cys Gly Ser
 181 aactctgcacatggcagactccggcagataaaacaccgtactccgtacaggcag
 47 Gln Leu Cys Thr Trp His Asp Ser Gly Glu Ile Asn Thr Gly Thr Pro Val Gln Ala
 241 gaaacgttgcacaatcccgaaagtactctgtccatgtgagcctggcagaccgttaaccat
 67 Gly Asn Val Arg Gln Ser Arg Lys Tyr Ser Val His Val Ser Leu Ala Asp Arg Asn Gln
 301 tctacgactttcgatatgaatcgataccttaggaacggcaatggcagaattttatctc
 87 Phe Tyr Asp Ser Phe Val Tyr Glu Ser Ile Pro Arg Asn Gly Asn Gly Arg Ile Tyr Ser
 361 ccacccgaccacctaacagcaatacatgttagtgcattgacgacggtatcatcg
 107 Pro Thr Asp Pro Pro Asn Ser Asn Thr Leu Asn Ser Ser Ile Asp Asp Gly Ile Ser Ile
 421 aaccatctctcgcatcaacatggctggccatgtcaatatacgtacggatgtcgaca
 127 Glu Pro Ser Leu Gly Ile Asn Met Ala Trp Ser Gln Phe Glu Tyr Arg Arg Asp Val Asp
 481 ttaagattactacaatcgatggctcaatattggatggcccttggacattgttattcggc
 147 Ile Lys Ile Thr Thr Ile Asp Gly Ser Ile Leu Asp Gly Pro Leu Asp Ile Val Ile Arg
 541 cgacttctgttaagtactcagtcaaaaagatgtgtgggtatcatttagatgtccct
 167 Pro Thr Ser Val Lys Tyr Ser Val Lys Arg Cys Val Gly Ile Ile Arg Val Pro
 601 atgatcccaatggcgaaattctgttggatggccatgtggacatttacagttacct
 187 Tyr Asp Pro Asn Gly Arg Lys Phe Ser Val Glu Leu Lys Ser Asp Leu Tyr Ser Tyr Leu
 661 ccgacgggtcgcaatatgtgacctctggagggagcgtgggtgtggagccaaaaatg
 207 Ser Asp Gly Ser Gln Tyr Val Thr Ser Gly Gly Ser Val Val Gly Val Pro Lys Asn
 721 ccctgggtatttgccagcccttctgccacggatatggcctcatgtacaccac
 227 Ala Leu Val Ile Phe Ala Ser Pro Phe Leu Pro Arg Asp Met Val Pro His Met Thr Pro
 781 acgacacccagacaatgaagccggccaaatcaataatggggactggggttcaaaggct
 247 His Asp Thr Gln Thr Met Lys Pro Gly Pro Ile Asn Asn Gly Asp Trp Gly Ser Lys Pro
 841 tactctactccgcctggcgatactggatgaacgaggatcacctctggtaaccccgaaa
 267 Ile Leu Tyr Phe Pro Pro Gly Val Tyr Trp Met Asn Gln Asp Thr Ser Gly Asn Pro Gly
 901 agctcggtcaaatcatatcggtggatccaaatcacctactgggtccatctagccccag
 287 Lys Leu Gly Ser Asn His Met Arg Leu Asp Pro Asn Thr Tyr Trp Val His Leu Ala Pro
 961 gagcctatgtgaaaggagccattgatgttacgaaagcaaaaattctatgcaacgggtc
 307 Gly Ala Tyr Val Lys Gly Ala Ile Glu Tyr Phe Thr Lys Gln Asn Phe Tyr Ala Thr Gly
 1021 atggcggtcttcagggtgagaactatgtttatcgccaatgcagctgataactatg
 327 His Gly Val Leu Ser Gly Glu Asn Tyr Val Tyr Gin Ala Ala Asp Asn Tyr Tyr
 1081 ccgtcaagagtgtggcacaaggcttgcataatgtgtggcacaacaacctggaggcggtc
 347 Ala Val Lys Ser Asp Gly Thr Ser Leu Arg Met Trp Trp His Asn Asn Leu Gly Gly
 1141 aaacatggtttgcattggggccaccattaaatgcaccggccgttaatacgtggactca
 367 Gln Thr Trp Phe Cys Met Gly Pro Thr Ile Asn Ala Pro Pro Phe Asn Thr Met Asp Phe
 1201 acggaaactctaataattccagccggatttagtgcataaaggcagggtggcgcttatttt
 387 Asn Gly Asn Ser Asn Ile Ser Ser Arg Ile Ser Asp Tyr Lys Gln Val Gly Ala Tyr Phe
 1261 tccaaacagacggaccggagatctacgaggacagtgttgcattgacgttctggcatg
 407 Phe Gln Thr Asp Gly Pro Glu Ile Tyr Glu Asp Ser Val Val His Asp Val Phe Trp His
 1321 ttaatgtatgtccatcaagacatatttccggagcttcaattcacgagcaaccatct

【도 1b】

427 Val Asn Asp Asp Ala Ile Lys Thr Tyr Ser Gly Ala Ser Ile Ser Arg Ala Thr Ile
 1381 ggaggtgtcacaatgacccgatcatacagatgggctggacgtacgaaatctcaccggaa
 447 Trp Arg Cys His Asn Asp Pro Ile Ile Gin Met Gly Trp Thr Ser Arg Asn Leu Thr Gly
 1441 tcagcattgataaacctgcacgtcatccacacgagatattcaaattctgaaacagtggttc
 467 Ile Ser Ile Asp Asn Leu His Val Ile His Thr Arg Tyr Phe Lys Ser Glu Thr Val Val
 1501 cttcagcaatcattggagcgcttcattctacgcaagtggaaatgactgttgcacccagcg
 487 Pro Ser Ala Ile Ile Gly Ala Ser Pro Phe Tyr Ala Ser Gly Met Thr Val Asp Pro Ser
 1561 agtccatcagcatgaccatctctaactgtgggtgtgagggtctatgcccctactgttcc
 507 Glu Ser Ile Ser Met Thr Ile Ser Asn Val Cys Glu Gly Leu Cys Pro Ser Leu Phe
 1621 gtatcactccgcttcagagctacaacaacccattgttcaagaacgtggcccttccgatg
 527 Arg Ile Thr Pro Leu Gin Ser Tyr Asn Asn Leu Val Val Lys Asn Val Ala Phe Pro Asp
 1681 gactgcagacaaatccaatcggaataggagagagcattaccaggcagctccggctgt
 547 Gly Leu Gln Thr Asn Pro Ile Gly Ile Gly Ser Ile Ile Pro Ala Ala Ser Gly Cys
 1741 caatggacttggaaatcacaaactggaccgtcaaaggacaaaaagtcaccatgaaaaact
 567 Thr Met Asp Leu Glu Ile Thr Asn Trp Thr Val Lys Gly Gln Lys Val Thr Met Gln Asn
 1801 ttcatccgggtcacttggccagttcgatatcgatgggtcatactggggtaatggtcca
 587 Phe Gln Ser Gly Ser Leu Gly Gln Phe Asp Ile Asp Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Trp Ser
 1861 taaaactaaagctattccattcacctgagtatttcgtgggttcaatgagttcttgttac
 607 Ile Asn *

1921 tgatggggccttgctagtggtaaaagttagaggacttgtcctgccggcgccaaggaa
 1981 **gttcatgtttcttagttgaatagtattgtttctctcgtaaaaaaaaaaaaaaaa**
 2041 aaaaaaaaaaaa 2052

【도 2】

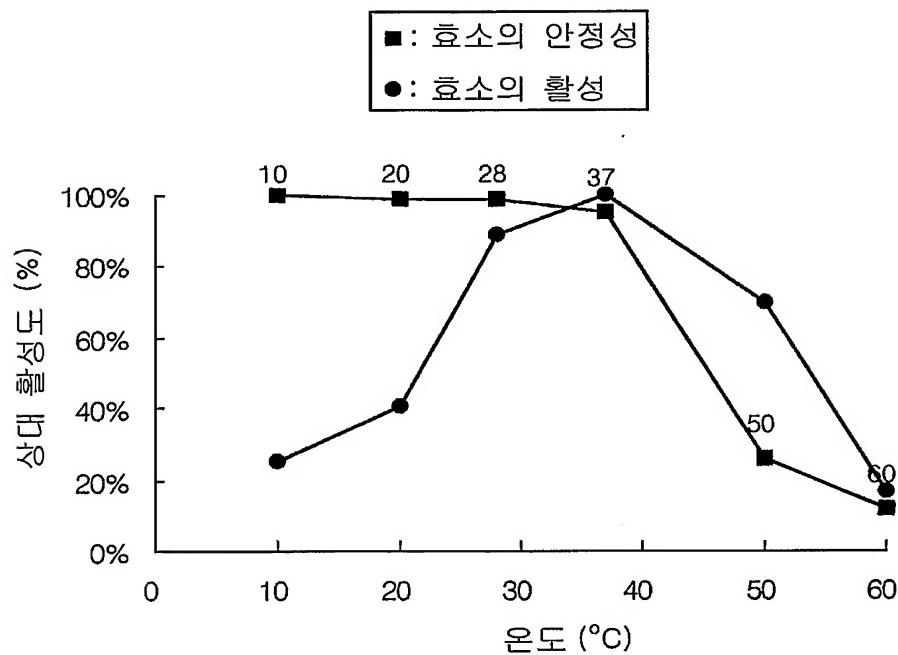




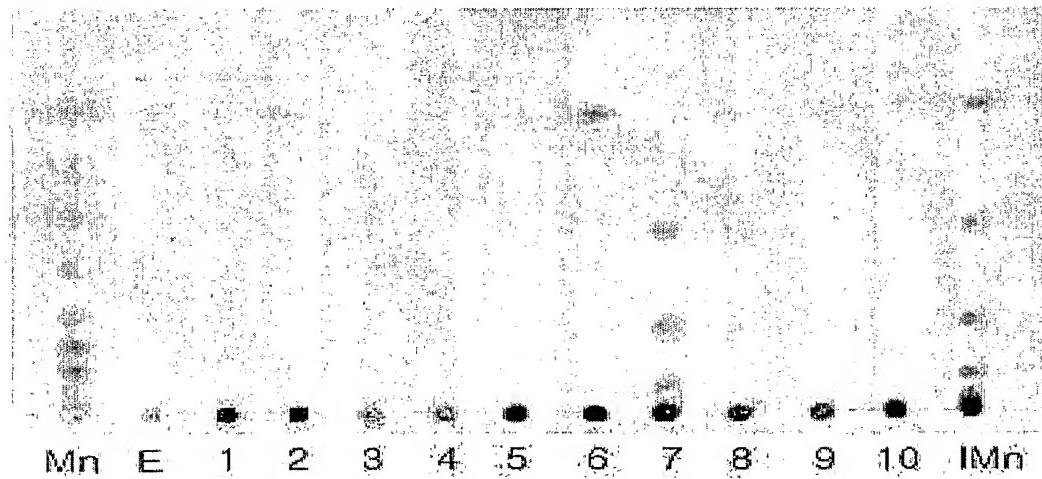
1020040006185

출력 일자: 2005/1/13

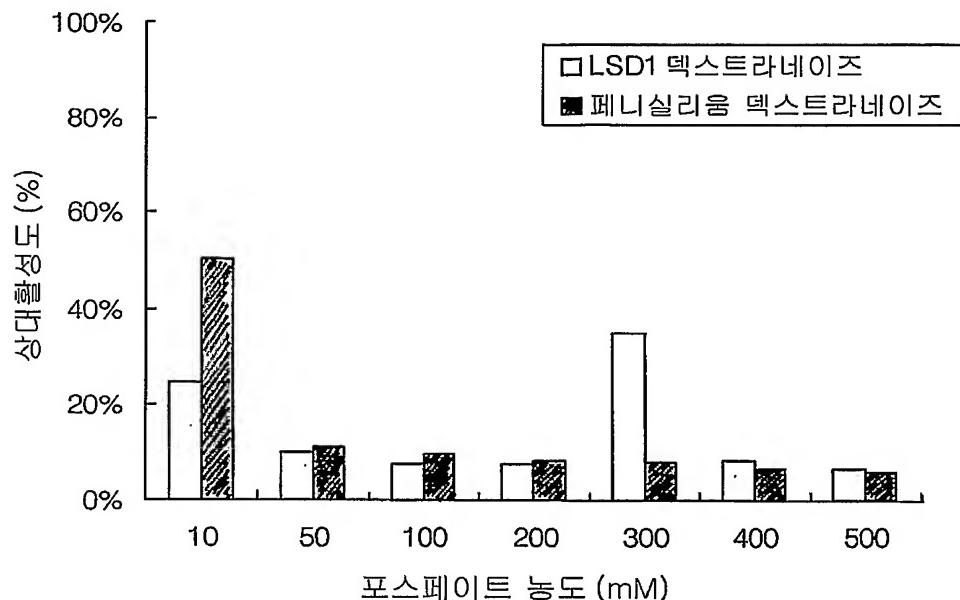
【도 3】



【도 4】



【도 5】



【서열목록】

<110> KIM, doman <120> Protein with the hydrolysis of mutan, inulin and levan, gene encoding said protein, the expressing host cell and methods for producing said protein <160> 4 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 608 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> S. cerevisiae/pYES2-LSD1 <400> 1 Met Thr Leu Ile Tyr Val Pro Ser Ile Phe Thr Met Val Pro Ser Ile 1
5 10 15 Thr Arg Ile Val Leu Val Asn Ile Leu Leu Ala
Thr Leu Val Leu Gly 20 25 30 Ala Ala
Val Leu Pro Arg Asp Asn Arg Thr Val Cys Gly Ser Gln Leu 35
40 45 Cys Thr Trp Trp His Asp Ser Gly Glu Ile Asn Thr Gly Thr Pro
Val 50 55 60 Gln Ala Gly Asn Val Arg Gln Ser
Arg Lys Tyr Ser Val His Val Ser 65 70 75

80 Leu Ala Asp Arg Asn Gln Phe Tyr Asp Ser Phe Val Tyr Glu Ser Ile
 85 90 95 Pro Arg Asn Gly Asn Gly Arg Ile Tyr Ser
 Pro Thr Asp Pro Pro Asn 100 105 110 Ser
 Asn Thr Leu Asn Ser Ser Ile Asp Asp Gly Ile Ser Ile Glu Pro 115
 120 125 Ser Leu Gly Ile Asn Met Ala Trp Ser Gln Phe Glu Tyr Arg Arg
 Asp 130 135 140 Val Asp Ile Lys Ile Thr Thr Ile
 Asp Gly Ser Ile Leu Asp Gly Pro 145 150 155
 160 Leu Asp Ile Val Ile Arg Pro Thr Ser Val Lys Tyr Ser Val Lys Arg
 165 170 175 Cys Val Gly Gly Ile Ile Ile Arg Val Pro
 Tyr Asp Pro Asn Gly Arg 180 185 190 Lys
 Phe Ser Val Glu Leu Lys Ser Asp Leu Tyr Ser Tyr Leu Ser Asp 195
 200 205 Gly Ser Gln Tyr Val Thr Ser Gly Ser Val Val Gly Val Glu
 Pro 210 215 220 Lys Asn Ala Leu Val Ile Phe Ala
 Ser Pro Phe Leu Pro Arg Asp Met 225 230 235
 240 Val Pro His Met Thr Pro His Asp Thr Gln Thr Met Lys Pro Gly Pro
 245 250 255 Ile Asn Asn Gly Asp Trp Gly Ser Lys Pro
 Ile Leu Tyr Phe Pro Pro 260 265 270 Gly
 Val Tyr Trp Met Asn Glu Asp Thr Ser Gly Asn Pro Gly Lys Leu 275
 280 285 Gly Ser Asn His Met Arg Leu Asp Pro Asn Thr Tyr Trp Val His
 Leu 290 295 300 Ala Pro Gly Ala Tyr Val Lys Gly
 Ala Ile Glu Tyr Phe Thr Lys Gln 305 310 315

320 Asn Phe Tyr Ala Thr Gly His Gly Val Leu Ser Gly Glu Asn Tyr Val
 325 330 335 Tyr Gln Ala Asn Ala Ala Asp Asn Tyr Tyr
 Ala Val Lys Ser Asp Gly 340 345 350 Thr
 Ser Leu Arg Met Trp Trp His Asn Asn Leu Gly Gly Gln Thr 355
 360 365 Trp Phe Cys Met Gly Pro Thr Ile Asn Ala Pro Pro Phe Asn Thr
 Met 370 375 380 Asp Phe Asn Gly Asn Ser Asn Ile
 Ser Ser Arg Ile Ser Asp Tyr Lys 385 390 395
 400 Gln Val Gly Ala Tyr Phe Phe Gln Thr Asp Gly Pro Glu Ile Tyr Glu
 405 410 415 Asp Ser Val Val His Asp Val Phe Trp His
 Val Asn Asp Asp Ala Ile 420 425 430 Lys
 Thr Tyr Tyr Ser Gly Ala Ser Ile Ser Arg Ala Thr Ile Trp Arg 435
 440 445 Cys His Asn Asp Pro Ile Ile Gln Met Gly Trp Thr Ser Arg Asn
 Leu 450 455 460 Thr Gly Ile Ser Ile Asp Asn Leu
 His Val Ile His Thr Arg Tyr Phe 465 470 475
 480 Lys Ser Glu Thr Val Val Pro Ser Ala Ile Ile Gly Ala Ser Pro Phe
 485 490 495 Tyr Ala Ser Gly Met Thr Val Asp Pro Ser
 Glu Ser Ile Ser Met Thr 500 505 510 Ile
 Ser Asn Val Val Cys Glu Gly Leu Cys Pro Ser Leu Phe Arg Ile 515
 520 525 Thr Pro Leu Gln Ser Tyr Asn Asn Leu Val Val Lys Asn Val Ala
 Phe 530 535 540 Pro Asp Gly Leu Gln Thr Asn Pro
 Ile Gly Ile Gly Glu Ser Ile Ile 545 550 555

560 Pro Ala Ala Ser Gly Cys Thr Met Asp Leu Glu Ile Thr Asn Trp Thr
 565 570 575 Val Lys Gly Gln Lys Val Thr Met Gln Asn
 Phe Gln Ser Gly Ser Leu 580 585 590 Gly
 Gln Phe Asp Ile Asp Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Trp Ser Ile Asn 595
 600 605 <210> 2 <211> 2052 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> S. cerevisiae/pYLSD1 <400> 2 tgggtgtgtc ctttgctctg
 ccaacgttgt tgattttt catgacatta atctacgtgc 60 cttcaatatt tacaatggtc
 ccctcaatca cacggattgt actggtaac attctgttgg 120 cgacgttggt tttggagct
 gcagtccttc cacgagacaa cagaactgtt tgcggagtc 180 aactctgcac atggcgcac
 gactccggcg agataaacac cggtaactcct gtacaggcag 240 gaaacgttcg acaatcccga
 aagtactctg tccatgtgag cctggcagac cgtaaccaat 300 tctacgactc tttcgatata
 gaatcgatac ctaggaacgg caatggcaga atttattctc 360 ccaccgaccc acctaacagc
 aatacattga atagtagcat tgacgacggt atatcaatcg 420 aaccatctct cggcatcaac
 atggcttggt cccagttcga atatagacga gatgtcgaca 480 ttaagattac tacaatcgat
 ggctcaatat tggatggccc ttggacatt gttattcggc 540 cgacttctgt taagtactca
 gtcaaaaagat gtgtgggtgg tatcattttt agagtcctt 600 atgatcccaa tggtcgaaaa
 ttctctgttg agttaaagag tgacctttac agttacctct 660 ccgacggttc gcaatatgtg
 acctctggag ggagcgtgg tgggtggag ccaaaaaatg 720 ccctgggtat ctggccagc
 ccttcttgc cacggatat ggttcctcat atgacaccac 780 acgacacccca gacaatgaag
 ccggcccaa tcaataatgg ggactgggt tcaaagccta 840 tactctactt cccgcctggc
 gtatactgga tgaacgagga tacctctgg aacccggga 900 agctcggctc aaatcatatg

cggtggatc ccaataccta ctgggtccat ctagccccag	960 gagcctatgt gaaaggagcc
attgagtatt tcacgaagca aaatttctat gcaacgggtc	1020 atggcgttct ctcaggttag
aactatgttt atcaggccaa tgcatgtat aactactatg	1080 ccgtcaagag tgcgtggcaca
agcttgagaa tgtggtggca caacaacctt ggaggcggtc	1140 aaacatggtt ttgcgtgggg
cccaccatta atgcaccgcc gtttaatacg atggacttca	1200 acggaaaactc taatatttcc
agccggatta gtgactataa gcagggttggc gcttattttt	1260 tccaaacaga cgaccggag
atctacgagg acagtgttgt ccatgacgtc ttctggcatg	1320 ttaatgtatga tgccatcaag
acatattatt ccggagcttc aattcacga gcaaccatct	1380 ggaggtgtca caatgaccgg
atcatacaga tgggctggac gtcacgaaat ctcaccggaa	1440 tcagcatttga taacctgcac
gtcatccaca cgagatattt caaatctgaa acagtggttc	1500 cttagcaat cattggagcg
tctccatttc acgcaagtgg aatgactgtt gatcccagcg	1560 agtccatcag catgaccatc
tctaacctgg tgtgtgaggg tctatgcccc tcactgttcc	1620 gatatcactcc gcttcagagc
tacaacaacc ttgttgtcaa gaacgtggcc tttcccgatg	1680 gactgcagac aaatccaatc
ggaataggag agagcattat accagcagct tccggctgt	1740 caatggactt ggaaatcaca
aactggaccg tcaaaggaca aaaagtccacc atgcaaaaact	1800 ttcaagtccgg gtcacttggc
cagttcgata tcgatggttc atactgggtt caatggtcca	1860 taaaactaaag ctattccat
tcacctgagt atttcgtgg gttcaatgag ttcttggttac	1920 tgatggggcc ctgtctgt
gtaaaagtag agggacttgt cctcgccggg cgccaaaggaa	1980 gttcatgtct tctagttgaa
tagtatttgt ttcttctctc tcgttaaaaa aaaaaaaaaa	2040 aaaaaaaaaaa aa

2052 <210> 3 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

L. starkeyi DX-F primer(sense) <400> 3' gtcccttgag ctcccaac

1020040006185

출력 일자: 2005/1/13

18 <210> 4 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

L. starkeyi DX-R primer(antisense) <400> 4 tcaactagaa ttcatgaact tcc

23